

## THIAMIN SACCHARIDE DERIVATIVE AND ITS PRODUCTION

Publication number: JP6041181

Publication date: 1994-02-15

Inventor: SUZUKI YUKIO; SUZUKI YASUSHI; NAGAMINE KOJI;  
ENDO KATSUMI

Applicant: TAKEDA SHOKUHIN KOGYO KK

Classification:

- International: A23L1/30; C07D415/00; C07H15/26; C12P19/58;  
A23L1/30; C07D415/00; A23L1/30; C07D415/00;  
C07H15/00; C12P19/00; A23L1/30; C07D415/00; (IPC1-  
7): A23L1/30; C07D415/00; C07H15/26; C12P19/58

- European:

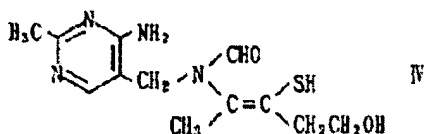
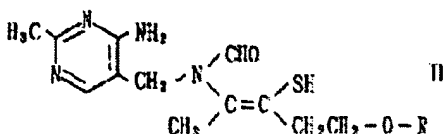
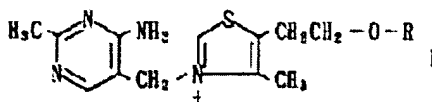
Application number: JP19930071640 19930330

Priority number(s): JP19930071640 19930330; JP19920074165 19920330

Report a data error here

## Abstract of JP6041181

PURPOSE: To provide a new odorless and stable derivative. CONSTITUTION: A derivative of formula I or formula II (R is a saccharide residue) or its salt. For example, thiamin- $\alpha$ -glucoside. The compound of formula I or formula II, for example, is obtained by reacting a compound of formula III or formula IV with a saccharide (e.g. starch, maltose or sucrose) in the presence of a glycosyltransferase [e.g. cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC-2,4,1,1,9) or dextrin dextranase (EC-2,4,1,2), etc.].



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-41181

(43) 公開日 平成6年(1994)2月15日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 15/26				
C 1 2 P 19/58		7432-4B		
// A 2 3 L 1/30		Z		
C 0 7 D 415/00				

審査請求 未請求 請求項の数3 (全 12 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平5-71640</p> <p>(22) 出願日 平成5年(1993)3月30日</p> <p>(31) 優先権主張番号 特願平4-74165</p> <p>(32) 優先日 平4(1992)3月30日</p> <p>(33) 優先権主張国 日本 (J P)</p> <p>特許法第30条第1項適用申請有り 1992年2月5日 社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌66巻03号講演要旨集」に発表</p>	<p>(71) 出願人 000238511 武田食品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目3番6号</p> <p>(72) 発明者 鈴木 幸雄 岡山県倉敷市石見町6番45号</p> <p>(72) 発明者 鈴木 綱 岡山県倉敷市石見町6番45号</p> <p>(72) 発明者 長峯 興治 兵庫県神戸市北区ひよどり台3丁目10番16-402号</p> <p>(72) 発明者 遠藤 勝美 大阪府池田市緑丘2丁目4番31-408号</p> <p>(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)</p>
---	--

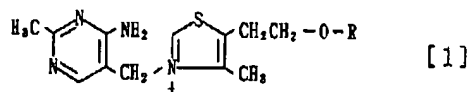
(54) 【発明の名称】 チアミン糖誘導体及びその製造法

(57) 【要約】

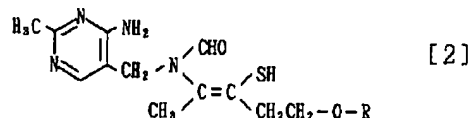
【目的】 無臭で安定な新規チアミン誘導体の提供。

【構成】 式

【化1】



又は

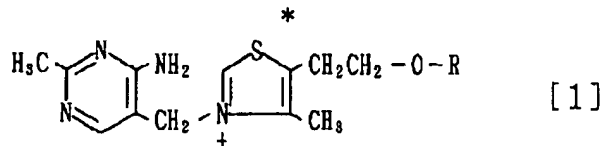


[式中、Rは糖残基を意味する。]で示される新規チアミン誘導体及びその塩を提供する。このチアミン誘導体はチアミンと糖を糖転移酵素の存在下に反応させて得られる。

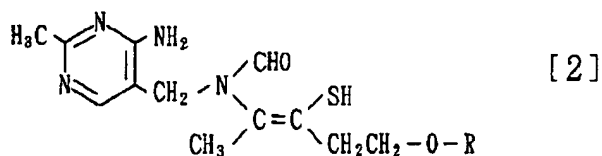
【特許請求の範囲】

【請求項1】 式

\* 【化1】



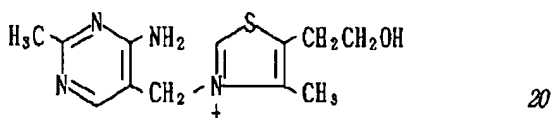
又は



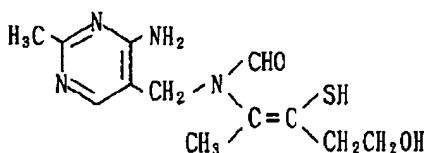
[式中、Rは糖残基を意味する。]で示されるチアミン糖誘導体又はその塩。

【請求項2】 式

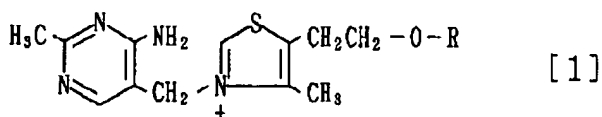
【化2】



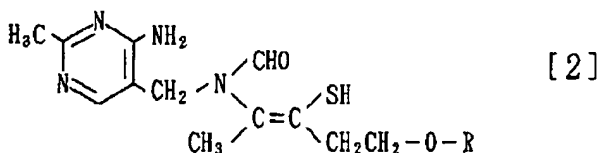
又は



※



又は



[式中、Rは糖残基を意味する。]で示されるチアミン糖誘導体又はその塩の製造法。

【請求項3】 糖転移酵素がシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ(EC 2. 4. 1. 1 9)、デキストリンデキストラナーゼ(EC 2. 4. 1. 2)、アミロスクラーゼ(EC 2. 4. 1. 4)、デキストランスクラーゼ(EC 2. 4. 1. 5)、イヌロスクラーゼ(EC 2. 4. 1. 9)、レバンスクラーゼ(EC 2. 4. 1. 10)、α-グルコシダーゼ(EC 3. 2. 1. 20)、β-グルコシダーゼ(EC 3. 2. 1. 21)、α-ガラクトシダーゼ(EC 3. 2. 1. 22)、β-ガラクトシダーゼ(EC 3. 2. 1. 23)、β-D-フルクトフラノシダーゼ(EC 3. 2. 1. 26)、キシラナーゼ(EC 3. 2. 1. 32)、アミロ-1, 6-グルコシダーゼ(EC 3. 2. 1. 33)、エキソ-1, 4-β-D-キシロシダーゼ(EC 3. 2. 1. 37)、プルラナーゼ(EC 3. 2. 1. 41)、セルラーゼ(EC 3. 2. 1. 4)又はα-L-アラビノフラノシダーゼ(EC 3. 2. 1. 55)である請求項2記載のチアミン糖誘導体又はその塩の製造法。

40 2. 1. 22)、β-ガラクトシダーゼ(EC 3. 2. 1. 23)、β-D-フルクトフラノシダーゼ(EC 3. 2. 1. 26)、キシラナーゼ(EC 3. 2. 1. 32)、アミロ-1, 6-グルコシダーゼ(EC 3. 2. 1. 33)、エキソ-1, 4-β-D-キシロシダーゼ(EC 3. 2. 1. 37)、プルラナーゼ(EC 3. 2. 1. 41)、セルラーゼ(EC 3. 2. 1. 4)又はα-L-アラビノフラノシダーゼ(EC 3. 2. 1. 55)である請求項2記載のチアミン糖誘導体又はその塩の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、無臭かつ安全性に優れたチアミン糖誘導体及びその製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】チアミンは必須ビタミンとして医薬品、食品の分野において広く使用されている。しかし、チアミンは特有の臭を呈する物質であり、熱、光、酸化、還元、細菌等によって分解や変性を受けることが知られている。このような特臭をもち不安定なチアミンを安定化する試みは数多くなされており、数多くの誘導体が開発されている。例えば、医薬や食品用にチアミンプロピルジスルフィド(TPD)、チアミンテトラヒドロフルフィリルジスルフィド(TTFD)、チアミン-8-メチル-6-アセチルジヒドロチオクテートジスルフィド(TATD)、O,S-ジベンゾイルチアミン(DBT)、O,S-ジカルボエトキシチアミン塩酸(DCET)、S-ベンゾイルチアミン-O-ーリン酸(BTMP)、O-ベンゾイルチアミンジスルフィド(BTDS)などが開発されている。これらの誘導体は吸収性にすぐれたものであるが、未だ特有の臭い、味を有し、その用途が制限され、\*

\*特に食品には使用しがたい。

【0003】

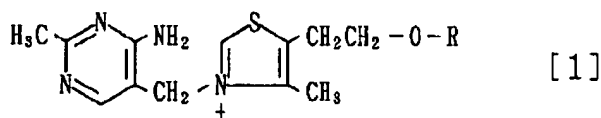
【発明が解決しようとする課題】前記したように、各種のチアミン誘導体が開発されているが、風味の点において、特有の臭、味を有しており使用しにくい。特に、食品に使用する場合、チアミン塩酸塩、チアミン硝酸塩、DBTHCl塩が食品添加物として許可されているが、特有のビタミン臭、苦味などがあり、使用食品、使用量が制限される。また、製造法の観点から、有機化学合成でなく生化学合成の方が食品用には好ましい。

【0004】

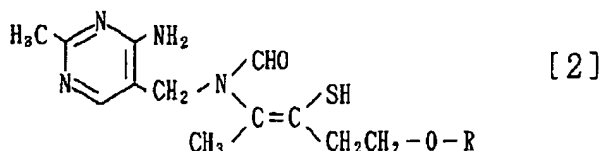
【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記の課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、次式[1]又は[2]で示される新規なチアミン糖誘導体が無臭で安定であることを見出した。また、この誘導体が、温和な条件下で生化学合成出来ることも見出した。本発明はこれらの新規な知見に基づいて完成されたものであり、本発明は式[1]又は式[2]

【0005】

【化4】



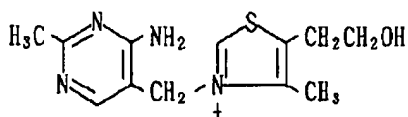
又は



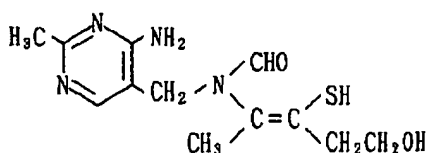
【0006】【式中、Rは糖残基を意味する。】で示される新規チアミン糖誘導体又はその塩を提供するものである。また、本発明は式

【0007】

【化5】



又は



【0008】で示される化合物と糖とを糖転移酵素の存在下に反応させることを特徴とする式[1]又は[2]で示されるチアミン糖誘導体又はその塩の製造法も提供する

ものである。

【0009】チアミンは通常、式[1]においてR=Hであるチアゾール型である。本品はアルカリ溶液で容易に式[2]においてR=Hであるチオール型に転換する。

【0010】本明細書におけるチアミンとは特に限定するものではないが、通常、その塩酸塩、硝酸塩を意味し、また、アルカリ処理して得られるチオール型チアミンはそのアルカリ塩(例:ナトリウム塩、カリウム塩)をも包含する。以下、特に断らない限り、チアゾール型及びチオール型を合わせてチアミンと称する。本発明でいう、チアミン糖誘導体とは式[1]または式[2]で示されるもの及びその塩(例:塩酸塩、硝酸塩、ナトリウム塩等)を意味する。

【0011】前記式[1]または式[2]におけるRで表される糖残基としては、4~6炭糖残基があげられ、具体的には、グルコース、ガラクトース、フルクトースなどの6炭糖、キシロース、アラビノースなどの5炭糖、エリスロースなどの4炭糖、及び各々の2~7個結合した

5

オリゴ糖などの残基が挙げられる。それらの結合様式は $\alpha$ -または $\beta$ -結合であってもよい。

【0012】本発明の式[1]又は[2]で示されるチアミン糖誘導体の具体例としては、チアミン- $\alpha$ -グルコシド、チアミン- $\beta$ -グルコシド、チアミン- $\alpha$ -ガラクトシド、チアミン- $\beta$ -ガラクトシド、チアミン- $\beta$ -フルクトシド、チアミン- $\alpha$ -アラビノシド、チアミン- $\beta$ -キシロシド、チアミン- $\beta$ -エリスロシド、チアミン- $\alpha$ -グルコオリゴ糖、チアミン- $\beta$ -グルコオリゴ糖、チアミン- $\alpha$ -ガラクトオリゴ糖、チアミン- $\beta$ -ガラクトオリゴ糖、チアミン- $\beta$ -フルクトオリゴ糖、チアミン- $\beta$ -キシロオリゴ糖、チアミン- $\alpha$ -アラビノオリゴ糖等が挙げられる。

【0013】本発明の式[1]又は[2]で示されるチアミン糖誘導体は、チアミンと糖とを糖転移酵素の作用により反応させることにより製造できる。

【0014】原料として使用しうる糖としては、澱粉または澱粉部分加水分解物、マルトース、ショ糖、フェニル- $\alpha$ -グルコシド、プルラン又はその部分加水分解物、セロビオース、フェニル- $\beta$ -グルコシド、セルロース部分加水分解物、メリピオース、ラフィノース、 $\alpha$ -ニトロフェニル- $\alpha$ -ガラクトシド、 $p$ -ニトロフェニル- $\alpha$ -ガラクトシド、フェニル- $\alpha$ -ガラクトシド、ラクトース、 $\alpha$ -ニトロフェニル- $\beta$ -ガラクトシド、 $p$ -ニトロフェニル- $\beta$ -ガラクトシド、フェニル- $\beta$ -ガラクトシド、レバン又はイヌリンの部分加水分解物、キシラン部分加水分解物、アラバン部分加水分解物、アラビノキシラン部分加水分解物、アラビノガラ

6

クタン加水分解物、 $\alpha$ -ニトロフェニル- $\beta$ -エリスロース、フェニル- $\beta$ -エリスロース等が挙げられる。

【0015】糖転移酵素は市販品或いは動物由来の酵素、植物由来の酵素、更には微生物の培養物由来の酵素を適宜選択出来る。また、これらの酵素を固定化して用いてもよい。用いる糖転移酵素としては、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ(EC 2. 4. 1. 19)、デキストリンデキストラナーゼ(EC 2. 4. 1. 2)、アミロスクラーゼ(EC 2. 4. 1. 4)、デキストランスクラーゼ(EC 2. 4. 1. 5)、イヌロスクラーゼ(EC 2. 4. 1. 9)、レバンスクラーゼ(EC 2. 4. 1. 10)、 $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3. 2. 1. 20)、 $\beta$ -グルコシダーゼ(EC 3. 2. 1. 21)、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ(EC 3. 2. 1. 22)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(EC 3. 2. 1. 23)、 $\beta$ -D-フルクトフラノシダーゼ(EC 3. 2. 1. 26)、キシラナーゼ(EC 3. 2. 1. 32)、アミロ-1, 6-グルコシダーゼ(EC 3. 2. 1. 33)、エキソ-1, 4- $\beta$ -D-キシロシダーゼ(EC 3. 2. 1. 37)、プルラナーゼ(EC 3. 2. 1. 41)、セルラーゼ(EC 3. 2. 1. 4)又は $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ(EC 3. 2. 1. 55)が挙げられる。これらの糖転移酵素は、用いる糖によって適宜選択するが、例えば、表1及び表2に示すごとく選択できる。

【0016】

【表1】

チアミン糖誘導体	糖	糖転移酵素
チアミン- $\alpha$ -グルコシド	マルトース、ショ糖	$\alpha$ -グルコシダーゼ、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ、デキストランスクラーゼ、デキストリンデキストラナーゼ、アミロスクラーゼ、アミロ-1, 6-グルコシダーゼ、ブルラナーゼ
チアミン- $\alpha$ -グルコオリゴ糖	フェニル- $\alpha$ -グルコシド 澱粉及び澱粉部分加水分解物 プルラン及びその部分加水分解物	
チアミン- $\beta$ -グルコシド	セロビオース、 フェニル- $\beta$ -グルコシド	$\beta$ -グルコシダーゼ、セルラーゼ
チアミン- $\beta$ -グルコオリゴ糖	セルロース部分加水分解物	
チアミン- $\alpha$ -ガラクトシド	メリビオース、ラフィノース	$\alpha$ -ガラクトシダーゼ
チアミン- $\alpha$ -ガラクトオリゴ糖	O-ニトロフェニル- $\alpha$ -ガラクトシド、p-ニトロフェニル- $\alpha$ -ガラクトシド フェニル- $\alpha$ -ガラクトシド フェニル- $\alpha$ -ガラクトシド	
チアミン- $\beta$ -ガラクトシド	ラクトース	$\beta$ -ガラクトシダーゼ
チアミン- $\beta$ -ガラクトオリゴ糖	O-ニトロフェニル- $\beta$ -ガラクトシド、p-ニトロフェニル- $\beta$ -ガラクトシド フェニル- $\beta$ -ガラクトシド フェニル- $\beta$ -ガラクトシド	

【0017】

【表2】

チアミン糖誘導体	糖	糖転移酵素
チアミン-β-フルクトシド	ショ糖	インベルターゼ
チアミン-β-フルクト	レバンおよびイヌリンの部分加水分解物	レバンあるいはイヌリン分解酵素
チアミン-α-アラビノシド	アラバン部分加水分解物	アラビノシダーゼ
チアミン-α-アラビノ	アラビノキシラン部分加水分解物	
チアミン-β-キシロシド	アラビノガラクトン部分加水分解物	
チアミン-β-キシロ	キシラン部分加水分解物	キシロシダーゼ
チアミン-β-エリスロシド	ニトロフェニルエリスロース	β-ガラクトシダーゼ
	フェニル-β-エリスロース	β-グルコシダーゼ

【0018】チアミン及び糖は、通常、適当なpHの緩衝液に溶解し、これに糖転移酵素を作用させ、反応させる。この反応時のチアミンの濃度は通常1w/v%以上、好ましくは約2~30w/v%であり、糖の添加量はチアミンに対して通常、重量比で約0.3~30倍の範囲が好適である。酵素反応時間と酵素量は、通常、経済性から3~80時間で反応が終了するよう酵素量が選ばれる。反応条件としては、通常、pH約3~9、温度約10~80℃の範囲が適当である。また、反応中にチアミ

ンが酸化分解を受けやすいので、できるだけ嫌気または還元状態で遮光下に維持するのが望ましい。

【0019】また、反応形式として1個のグリコシル基が結合したチアミン糖誘導体とグリコシル糖との混液に糖転移酵素を作用させて、グリコシル糖のグリコシル基をチアミン糖誘導体へ連続的に転移し2~7個のグリコシル基の結合したオリゴ糖タイプを生成させてもよい。

【0020】更に、チアゾール型チアミン糖誘導体は20当量のアリカリ溶液中でチオール型チアミン糖誘導体に

転換される。添付の図1にチアゾール型チアミン糖誘導体(チアミンI)のアリカリ液の経時的紫外線吸収曲線を示す。図1から明らかなごとく、335~340nmの吸収が経時的になくなりチアゾール型チアミンがチオール型に転換している。

【0021】このように生成せしめたチアミン糖誘導体を含む溶液はそのままチアミン糖誘導体含有製品として用いてもよいが、更に精製して、チアミン糖誘導体を単離すれば利用しやすい。精製方法としては膜分離、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどの方法で分離精製すれば高純度の製品を得ることが出来る。このようにして得られたチアミン糖誘導体は無臭であり、特有のビタミン臭を有しなく、いろいろな食品、医薬品等に添加利用出来、その添加方法は従来のチアミンと同様である。また体内の酵素によりチアミンとグリコシル糖化合物に容易に加水分解されチアミン本来の生理活性を示す。このように無臭でチアミン活性を有するチアミン糖誘導体はその特徴を生かし普通一般の飲食物に強化剤として使用出来る。例えば、調味料、洋菓子、和菓子、パン、麺類、漬物、そう菜食品、清涼飲料、ドリンク類にチアミン強化剤として使用出来る。また、これに限らず、従来のチアミン誘導体と同様な用途にも用いることができる。

【0022】

【実施例】次に本発明を実施例により具体的に説明する。

#### 実施例1

塩酸チアミン8.43gおよびo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド3.0gを0.1Mリン酸緩衝液(pH5.0)37mlに溶解後、pHを5.0に水酸化ナトリウムで補正した。ついで、アセトニトリル25mlおよび0.1Mリン酸緩衝液(pH5.0)3mlに溶解したアスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)由来のβ-ガラクトシダーゼ(株式会社興人製)19,500単位を加え、遮光下、20℃で48時間反応させた。反応後、反応液を沸騰水浴中に5分間浸漬し、酵素を失活させて反応を停止した。ついで、本品に等量のエチルエーテルを加えて攪拌後、水層を東洋濾紙No.50(40×40cm)1枚当たり1mlの割で帯状に塗り、展開剤(n-ブタノール:酢酸:水=2:1:1、v/v)を用いて、上昇法により展開した。展開後、ペーパークロマトグラムに、チアミンよりRf値が低い2ヶの新しいチアミン誘導体IおよびII(アリカリ性フェリシアン化カリウム溶液を噴霧し、生成したケイ光により確認)の生成を認めた。未噴霧のペーパークロマトグラムからチアミン誘導体IおよびIIに相当する各区分を切り取り、細片化し、水で抽出した。水抽出液(pH4.2)中の各誘導体をチオクローム法により測定したところ、チアミンに対する反応収率はそれぞれ約20%および2%であった。主生成物であ

る誘導体Iの水抽出液を真空凍結乾燥後、得られた粉末を少量の水に溶解し、活性ビタチエンジ(和光純薬工業株式会社製)を充填したカラム(2.6×13cm)に通した。カラムを充分水洗後、25%塩化カリウム溶液で溶出した。誘導体Iを含む溶出液に氷冷下3倍量のエタノールを加え、過剰の塩化カリウムを除去し、得られた濾液を減圧濃縮後、再度3倍量のエタノールを加えて残存塩化カリウムを除去することをくり返した。この濾液をゲル濾過剤(商品名、トヨパールHW40S、東ソー株式会社製)のカラム(2.6×70cm)を用いて、水を溶出液としてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、誘導体I溶出区分を真空凍結乾燥、粉末化して、チアミン誘導体Iの精製標品を、収率約30%で得た。

【0023】本精製標品を用いて、次に示す理化学的性質を調べた。

(1) 融点:143-147℃(分解)

【0024】(2) 紫外線吸収スペクトル:日立自記分光光度計EPS-3T型を用いて測定した。チアミンと全く同様に、pHによって著しく変化した。0.1N塩酸溶液中では247~248nmに、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)中では234nmと267nmに、0.1M水酸化ナトリウム溶液中では、231nmと335~340nmにそれぞれ吸収極大を示した。これらの吸収極大の波長位置はチアミンのそれらと極めて類似していた。紫外線吸収スペクトルを図2-図4に示す。図2-図4中、点線はチアミンを、実線はチアミン誘導体Iを表す。図2、図3及び図4は、各々、0.1N塩酸中、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)及び0.1N水酸化ナトリウム溶液中のスペクトルを表す。

【0025】(3) 赤外線吸収スペクトル:日立赤外分光光度計260-30型を用いてKBr錠剤法で測定した。チアミンと同様に、1655、1605、1220、1053、950、775、700cm<sup>-1</sup>に吸収を示した。チアミン誘導体Iの赤外線吸収スペクトルを図5に示す。

【0026】(4) NMRスペクトル:バリアン社製NMR測定装置VXR-500型(500MHz)を用いて測定した。チアミン誘導体Iの<sup>13</sup>C-NMR(δ値ppm)は次ぎのとおりである。



13

チアミンのC-1	164.86
C-2	155.45
C-3	107.05
C-4	163.91
C-5	50.99
C-6	146.78
C-7	143.94
C-8	137.10
C-9	12.11
C-10	28.04
C-11	69.13
C-12	22.31
ガラクトースのC-1	103.74
C-2	71.71
C-3	73.75
C-4	69.62
C-5	76.20
C-6	61.97

【0027】(5) 溶剤に対する溶解性:水に易溶、メタノールに可溶、エタノールに難溶、エーテル、ベンゼン、クロロホルムに不溶。

【0028】(6) 安定性:

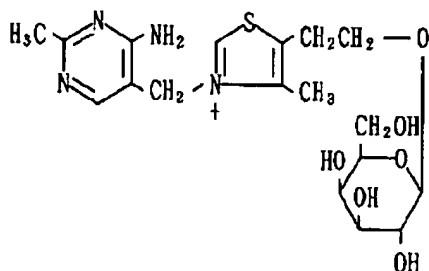
(a) エシェリヒア・コリおよびアスペルギルス・オリゼの各β-ガラクトシダーゼ作用、または1N塩酸、100℃、60分間処理により加水分解され、チアミンとガラクトースをモル比1:1で生成した。

(b) モルティエラ・ピナセア (*Mortierella vinacea*) 由来のα-ガラクトシダーゼによっては加水分解されなかった。

以上の結果から、上記で得られたチアミン誘導体Iが次式に示す構造を有する(チアミン-β-ガラクトシドである)ことが判明した。

【0029】

【化6】



【0030】実施例2

塩酸チアミン6.7gおよびセロピオース2gを0.2M酢酸緩衝液(pH5.0)15mlに溶解後、pH4.0に塩酸で補正した。ついで、少量の0.2M酢酸緩衝液(pH4.0)に溶解したトリコデルマ・ヴィリド(*Trichoderma viride*)由来のセルラーゼT(天野製薬株式会社製)6,000単位を加え、遮光下、37℃で48時間反応させた。反応後、生成した新規の2つのチアミン誘導体のう

14

ち、主生成誘導体(チアミンに対する反応収率約18%)を実施例1に準じて、ペーパークロマトグラフィー、活性ビタチエンジへの吸・脱着、ゲル濾過、真空凍結乾燥などにより精製、単離した。本精製標品は、紫外線吸収スペクトルがチアミンのそれと極めて類似し、チオクローム反応陽性、酸及び酵素アーモンドβ-グルコシダーゼを用いての分解により、チアミンとグルコース(モル比1:1)を生成したので、チアミン-β-グルコシドであることが判明した。

10 【0031】実施例3

塩酸チアミン61.75gおよびデキストリン(DE 8±1、松谷化学工業株式会社製(パインデックス#1))125g、塩化カルシウム961mgを0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)600mlに溶解後、pHを5.5に水酸化ナトリウムで補正した。更に、0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)で1225mlに調製した。次いで、バチルス・ステアロサーモフィラス(*Bacillus stearothermophilus*)由来のサイクロデキストリン生成酵素(cyclomalto-dextrin glucanotransferase EC 2.4.1.19 1400 units/g)5mlを加え遮光下、37℃で72時間反応させマルトオリゴ糖類を生成させた。反応後、反応液を沸騰水浴中で10分間浸漬し、酵素を失活させて反応を停止した。

【0032】この反応液1mlをフィルターディスミッケー25CS(セルロースアセテート膜、0.45μm、アドバンテック社製)により濾過後、濾液中のチアミン及びその誘導体を、ウォーターズ社製高速液体クロマトグラフ装置(U6K型インジェクター、510型ポンプ、441型紫外外部吸収検出器、及び島津クロマトバックC-RIBにより構成されたシステム)を用いて分析した。(分析条件:カラム、旭化成社製アサヒバックGS-320 7.6×500mm;溶媒、0.04Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0);流速、1ml/min;検出波長、280nm)その結果、チアミン及びその誘導体と思われる数多くの新規溶出ピークNo. I、II、III、IV及びVを認めた。(図6)

【0033】また、反応液0.5mlを東洋濾紙No. 50(40×40cm)に帯状(巾15cm)に塗り、展開剤(n-ブタノール:ピリジン:水=6:4:4 v/v)を用いて、上昇法により展開したところ、ペーパークロマトグラム上に、Rf値がチアミンより低い、帯状の数多くの新規チアミン誘導体(アルカリ性フェリシアン化カリウム溶液を噴霧し、生成したケイ光により確認)の生成を認めた。次に、0.1N塩酸により反応液のpHを4.5に補正後グルコアミラーゼ177.5mg(33.0 units/mg TOYOBO)を添加し、暗所で37℃で13時間反応させた。反応後、pHを5.0に水酸化ナトリウムで補正し、反応液を沸騰水溶液中で10分間浸漬し、酵素を失活させて反応を停止した。

【0034】次いで、反応液を東洋濾紙No. 50(40

15

×40cm)1枚当り2mlの割で帯状に塗り、展開剤(n-ブタノール:ピリジン:水=6:4:4 v/v)を用いて上昇法により室温で2日間展開した。展開後、チアミン誘導体I相当部(図6)を切り取り細片にし5%エタノール水溶液を用いて、室温(8~10℃)で2日間抽出した。抽出液を減圧濃縮し、真空凍結乾燥して52gのチアミン誘導体I相当部(図6)粉末を得た。得られた粉末を水に溶解し、活性ピタチエンジ(和光純薬工業株式会社製)825gを充填したカラム(5.6×13cm)に通した。

【0035】カラムを充分水洗後25%塩化カリウム溶液で溶出した。チアミン誘導体Iを含む溶出液に氷冷下3倍量のエタノールを加え、過剰の塩化カリウムを除去し、得られた濾液を減圧濃縮後、再度3倍量のエタノールを加えて残存塩化カリウムを除去することをくり返した。この濾液を減圧濃縮後、凍結乾燥し、チアミン誘導体I相当部(図6)粉末を得た。得られた粉末を少量のメタノールに溶解し不溶のサイクロデキストリンを除去後活性炭で脱色処理した。この濾液をゲル濾過剤(商品名、トヨパールHW40S、東ソー株式会社製)のカラム(2.6×70cm)を用いて、水を溶出液としてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、チアミン誘導体I溶出区分を真空凍結乾燥、粉末化して、チアミン誘導体I(図6)の精製標品を、収率約30%で得た。

【0036】本精製標品を用いて、次に示す理化学的性質を調べた。

(1) 融点:129-131℃(分解)

(2) 紫外線吸収スペクトル:日立自記分光光度計ESP-3T型を用いて測定した。

チアミンと全く同様に、pHによって著しく変化した。0.1N塩酸溶液中では248~249nmに、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)中では238nmと270~275nmに、0.1N水酸化ナトリウム溶液中では247nmと335~345nmにそれぞれ吸収極大を示した。これらの吸収極大の波長位置はチアミンのそれらと極めて類似していた。紫外吸収スペクトルを図7-図9に示す。図7-図9中、(イ)はチアミンを(ロ)はチアミン誘導体Iを表す。図7、図8及び図9は、各々、0.1N塩酸中、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)及び0.1N水酸化ナトリウム溶液中のスペクトルを表す。

【0037】(3) 赤外線吸収スペクトル:日立赤外分光光度計260-30型を用いてKBr錠剤法で測定した。チアミンと同様に、1655、1605、1220、1053、950、775、700cm<sup>-1</sup>に吸収を示した。チアミン誘導体Iの赤外線吸収スペクトルを図10に示す。

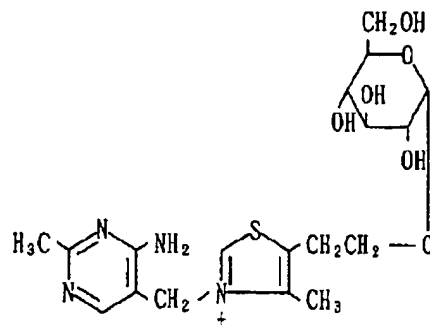
16

(4) 溶剤に対する溶解性:水に易溶、メタノールに可溶、エタノールに難溶、エーテル、ベンゼン、クロロホルムに不溶

以上の結果から、上記で得られたチアミン誘導体Iが次式に示す構造を有するチアミン-α-グルコシドであることが判明した。

【0038】

【化7】



【0039】

【発明の効果】本発明によれば、特に食品用に有用な、無臭で安定な新規チアミン誘導体を提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のチアミン誘導体のアルカリ液中におけるチアゾール型からチオール型への経時変化を示す紫外線吸収スペクトルである。

【図2】 チアミン及びチアミン誘導体Iの0.1N塩酸中における紫外線吸収スペクトルである。

【図3】 チアミン及びチアミン誘導体Iの0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)中における紫外線吸収スペクトルである。

【図4】 チアミン及びチアミン誘導体Iの0.1N水酸化ナトリウム溶液中における紫外線吸収スペクトルである。

【図5】 チアミン誘導体Iの赤外線吸収スペクトルを示す。

【図6】 チアミン誘導体Iの高速液体クロマトグラムを示す。

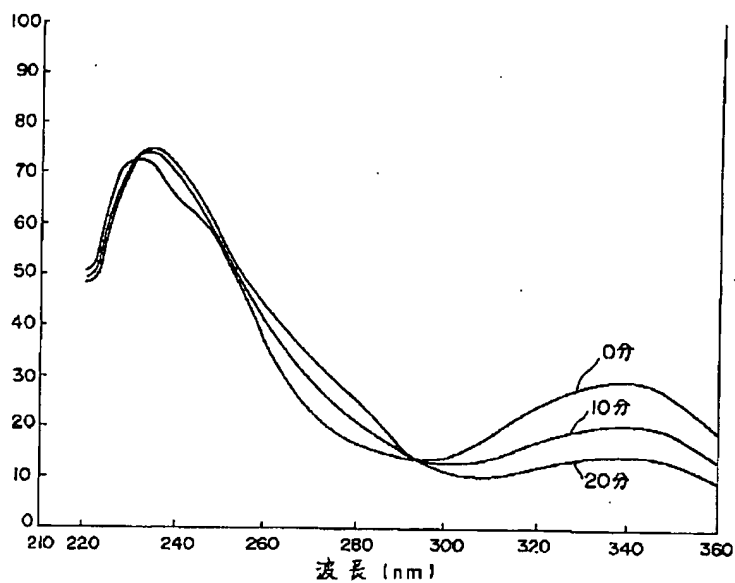
【図7】 チアミン及びチアミン誘導体Iの0.1N塩酸中における紫外線吸収スペクトルである。

【図8】 チアミン及びチアミン誘導体Iの0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)中における紫外線吸収スペクトルである。

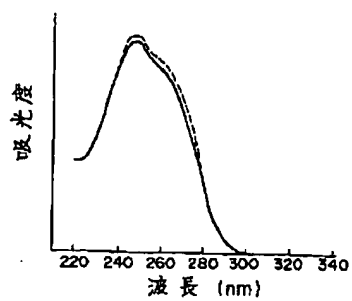
【図9】 チアミン及びチアミン誘導体Iの0.1N水酸化ナトリウム溶液中の紫外線吸収スペクトルである。

【図10】 チアミン誘導体Iの赤外線吸収スペクトルである。

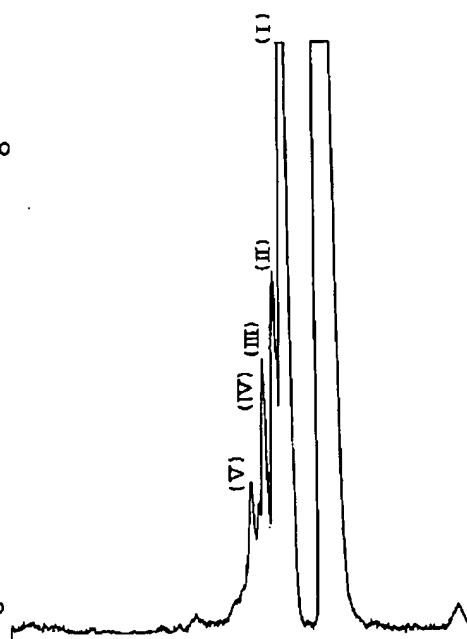
【図1】



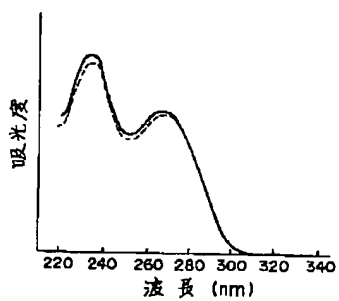
【図2】



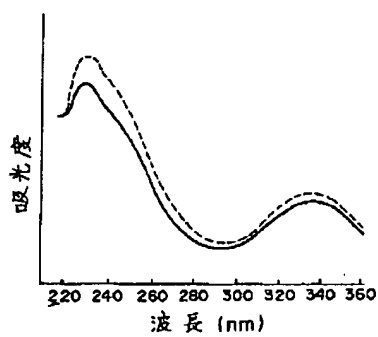
【図6】



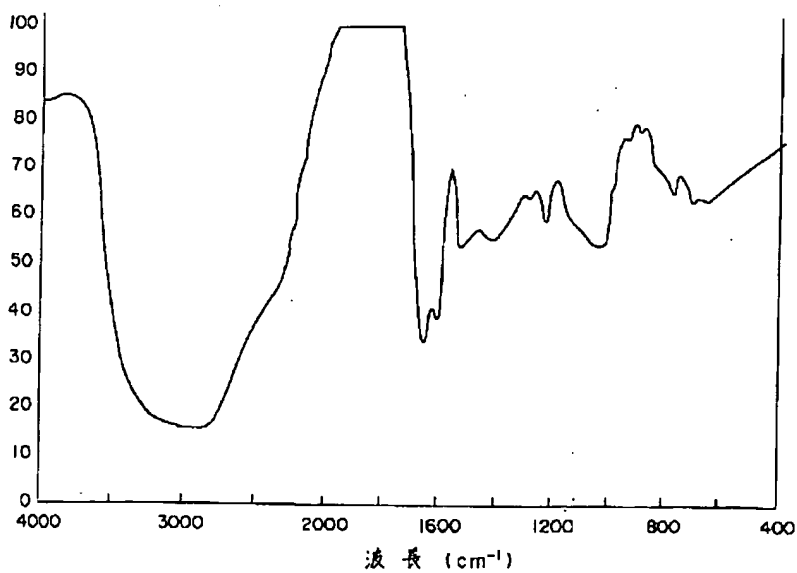
【図3】



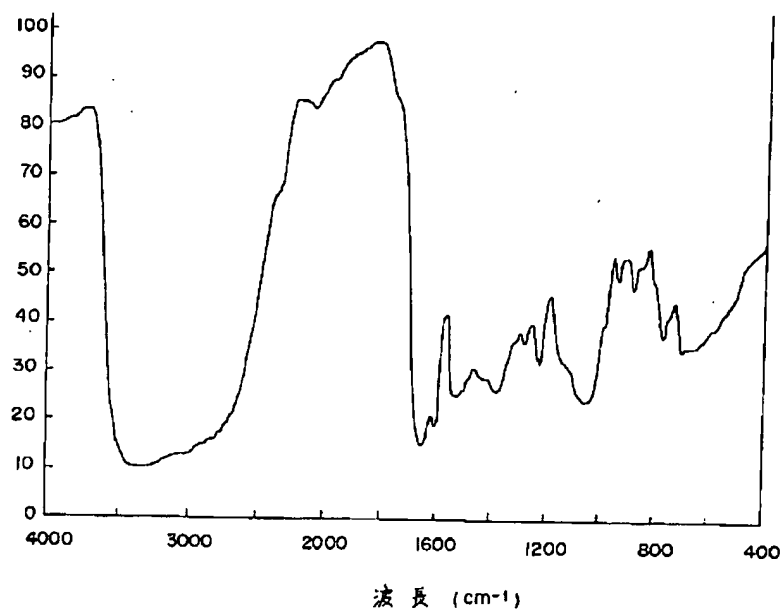
【図4】



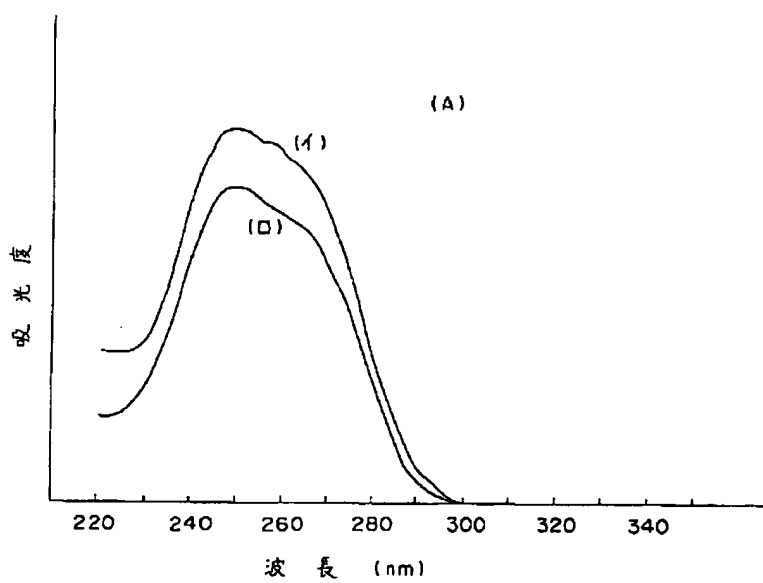
【図10】



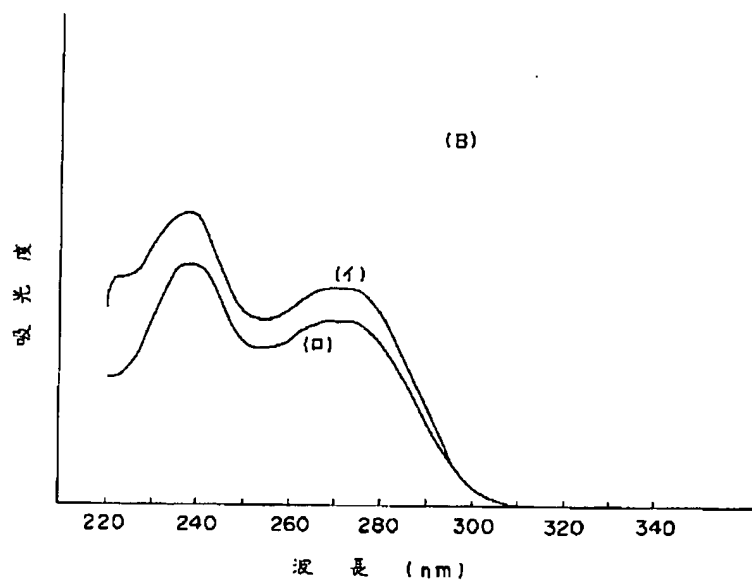
【図5】



【図7】



【図8】



【図9】

